ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1981 N° 60

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MALADIE D'AUJESZKY
EXCRETION DU VIRUS PAR LES SECRETIONS GENITALES DU VERRAT

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Bernard, Jean, Louis GUEGUEN
Né le 18 Février 1952 à FOUESNANT (Finistère)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : M. CHANTAL
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. SAURAT
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Élèves
E.N.V.T.

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1981 N° 60

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MALADIE D'AUJESZKY
EXCRETION DU VIRUS PAR LES SECRETIONS GENITALES DU VERRAT

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Bernard, Jean, Louis GUEGUEN
Né le 18 Février 1952 à FOUESNANT (Finistère)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs :
M. CHANTAL
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. SAURAT
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Élèves
E. N. V. T.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE
Directeur honoraire ..... M. FLORIO
Professeurs Honoraires ..... M. BRIZARD
M. BERTHELON
M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître-Assistant ..... M. BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie Biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître-Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître-Assistant ..... M. SAUTET

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie et Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET D'INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-de Conférences ..... M. EECHKOUTTE
Maître-Assistant agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées alimentaires d'Origine Animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître-Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître-Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equides et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître-Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des Animaux de Basse-Cour - Clinique
Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître-Assistant Agrégé ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie
Chirurgicale - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL
Maître-Assistant Agrégé ..... M. TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie
de la Reproduction - Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître de Conférences ..... M. GANIERE
Maître-Assistant ..... M. PICAVET

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître-Assistant ..... M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître-Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée
Hygiène Générale - Zootechnie - Elevage
Economie Générale et des Productions Animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. Les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924)

A MA FEMME,

pour qui pendant deux ou trois ans, le mot "thèse" a signifié "mauvaises vacances"

A AYMERIC et EMILIE

A MES PARENTS

Que ce travail soit un témoignage de toute l'affection et de la reconnaissance que je leur porte

A MES BEAUX-PARENTS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur ARMENGAUD de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur CHANTAL, qui nous a guidé dans l'élaboration de ce travail.

Monsieur le Professeur Honoraire SAURAT que nous remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

Au Docteur AYNAUD,
Directeur du Laboratoire de Pathologie Porcine,
Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie

Au Docteur VANNIER,
Directeur adjoint de la Station de Pathologie Porcine
de Ploufragan

qui nous ont fait la joie de nous accueillir dans leurs équipes et qui nous ont guidé dans l'exécution de nos expérimentations.

A Monsieur ZERT,
Directeur de l'Institut Technique de Porc

qui a bien voulu nous intégrer dans son Institut afin de mener à bien ce travail.

Au Professeur TOMA,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

que nous remercions vivement d'avoir bien voulu nous fournir la souche virale isolée au Laboratoire de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Aux techniciens de la Station de Recherche de Virologie de l'I.N.R.A. et à ceux de la Station de Pathologie Porcine de Ploufragan et en particulier à Roland CARIOLET et Bernard BEAUREPAIRE dont la patience et la haute technicité nous ont permis de réaliser les prélèvements avec régularité.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Première Partie : LA MALADIE D'AUJESZKY CHEZ LE PORC

A) HISTORIQUE

B) L'AGENT PATHOGENE

1) Etude physicochimique du virus

2) Etude biologique du virus

a) culture
b) pouvoir pathologique et antigène

C) ETUDE CLINIQUE, EPIDEMIOLOGIQUE et DIAGNOSTIC

1) Symptômes

2) Epidémiologie

a) source du virus et résistance du virus
b) contagion
c) évolution dans un élevage

3) Diagnostic

a) sur le terrain
b) au laboratoire

D) IMMUNITE ET PROPHYLAXIE DE LA MALADIE D'AUJESZKY

1) Immunité spontanée

a) immunité humorale
b) immunité cellulaire

2) Immunité vaccinale, prophylaxie médicale

3) Prophylaxie sanitaire

4) La maladie d'Aujeszky : maladie légalement contagieuse

Deuxième Partie : QUELQUES DONNEES SUR L'EXCRETION GENITALE MICROBIENNE CHEZ LE VERRAT ET D'HERPES VIRUS CHEZ QUELQUES AUTRES ESPECES

A) LE VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY

B) AUTRES VIRUS ET MYCOPLASMES CHEZ LE PORC

1) Les parvovirus

2) Les entérovirus

3) Le virus de la peste porcine " chronique "

4) Les mycoplasmes

C) L'HERPES VIRUS DE L'HOMME ET LE VIRUS DE LA RINOTRACHEITE BOVINE

Troisième Partie : EXPERIMENTATION SUR LES PORCS

A) EXPERIMENTATION SUR LES PORCS PREPUBERES

1) Matériel et méthodes

a) inoculation des porcelets et prélèvements
b) traitement des échantillons
c) recherche des anticorps neutralisants
d) recherche du virus infectieux.

2) Résultats

a) présence du virus dans les sécrétions
b) recherche du virus dans les organes prélevés à l'abattage
c) cinétique d'apparition des anticorps neutralisants dans le sérum

B) EXPERIMENTATION SUR LES VERRATS

1) Matériel et méthodes

a) inoculation des porcs et prélèvements
b) traitement des échantillons

2) Résultats

a) présence du virus dans les secrétions préputiales
b) présence du virus dans le sperme
c) recherche du virus dans les organes prélevés à l'abattage

d) cinétique d'apparition des anticorps neutralisants dans le sérum, le sperme et les sécrétions préputiales

C) DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION

Devant les problèmes posés par le développement des troubles de la reproduction dans les élevages porcins et la nécessité de la mise en place d'un programme de contrôle sanitaire des reproducteurs, en particulier chez le verrat dont le sperme peut véhiculer divers agents infectieux, nous avons envisagé une étude sur les possibilités de transmission de quelques maladies virales par le sperme ; pour ce faire, et en particulier pour essayer de connaître les conditions de l'excrétion de virus dans le sperme (fréquence, intensité, durée, etc.) et dans les sécrétions du fourreau, nous nous sommes proposé d'étudier la maladie d'Aujeszky et ce pour plusieurs raisons :

- le virus de la maladie d'Aujeszky se rattache aux herpès virus ; ces derniers, à la suite d'une infection initiale, persistent parfois très longtemps chez leur hôte sous forme d'une infection latente et se manifestent au bout de plusieurs mois en entraînant l'apparition de lésions caractéristiques.

- au cours de ces dernières années, la maladie d'Aujeszky s'est fortement développée en France et est devenue l'un des premiers fléaux de l'élevage porcin.

- le virus de la maladie d'Aujeszky est d'une étude relativement aisée ; en effet, il se multiplie rapidement sur cultures cellulaires, et l'effet cytopathogène qu'il produit est caractéristique.

Dans une première partie, nous rappelons succinctement ce qu'est la maladie d'Aujeszky, en insistant particulièrement sur le diagnostic, l'immunité et la prophylaxie.

Dans une seconde partie, nous donnerons quelques exemples d'excrétion génitale de virus et mycoplasmes chez le porc, ainsi que de l'herpès virus chez l'homme et du virus de la rhinotrachéite chez les bovins.

Dans une troisième partie, nous aborderons l'expérimentation ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.

Première Partie

LA MALADIE D'AUJESZKY CHEZ LE PORC

A - Historique

La maladie d'Aujeszky, bien qu'existant en France depuis longtemps (le premier cas suspect ayant été décrit en 1912 par CADEAC), est restée longtemps sous la forme d'une maladie sporadique d'apparition exceptionnelle. En effet, jusqu'en 1967, 19 foyers seulement avaient été observés. Depuis 1968, elle s'est considérablement développée, surtout dans les départements à forte concentration porcine ; c'est ainsi qu'une enquête épidémiologique (32), réalisée à partir de 1970, a permis de constater une circulation à bas bruit du virus dans la population porcine et, par conséquent, une très grande fréquence de l'infection inapparente, surtout en Bretagne.

Depuis, de nombreux départements où la maladie n'avait pas été soupçonnée se sont révélés être infectés.

Cette situation pourtant fort préoccupante a semblé laisser indifférents, pendant de nombreuses années, les pouvoirs publics, ce qui faisait dire au Professeur LAUTIE en 1974 (13) : "La France semble se désintéresser de la lutte contre la maladie d'Aujeszky, comme si cette maladie n'existait pas et ne progressait pas dans notre pays. Certes, aucun vaccin contre la maladie d'Aujeszky n'est autorisé ; mais aucune politique officielle n'a vu le jour". Depuis, les choses ont évolué, du moins en théorie, car la vaccination est autorisée en France et, depuis le décret du 19 juillet 1977, la maladie d'Aujeszky est considérée comme une maladie légalement contagieuse et est donc soumise à déclaration.

B - L'agent pathogène

L'agent pathogène est un virus appartenant au groupe herpès virus et plus particulièrement au sous-groupe "A" qui comprend des virus facilement libérés par la cellule comme ceux responsables de l'Herpes simplex de l'homme ou de la rhinotrachéite bovine.

1. Etude physico-chimique du virus

La particule virale, mesurée au microscope électronique, a un diamètre variant entre 150 et 180 nm. Le virion a une capside de 110 nm de forme hexagonale et composée de 162 capsomères. Comme les autres virus appartenant à son groupe, son enveloppe possède de multiples membranes semblant représenter des stades différents de l'ontogénèse du virus (12).

Le virus, ultrafiltrable, sensible à l'éther et au chloroforme, est inactivé rapidement par la chaleur mais, par contre, se conserve très bien au froid ; ainsi, aussi bien les cultures virales que les prélèvements sont le plus souvent conservés à - 70°C (12).

Comme tout Herpès virus, l'acide nucléique le constituant est un ADN bicaténaire.

2. Etude biologique du virus

a) Culture

Depuis que TRAUB, en 1933 (33), réussit le premier à cultiver le virus de la maladie d'Aujeszky sur des milieux composés de fragments d'embryons de poulets et de testicules de lapins placés en suspension, de nombreux systèmes de cultures ont été utilisés, mais tous n'ont pas la même sensibilité.

L'ovoculture est actuellement peu utilisée car c'est une méthode peu sensible, qui ne permet d'obtenir des titres élevés de virus que lorsque le virus est adapté à l'oeuf.

Après avoir employé différents types de culture cellulaire (fibroblastes d'embryon de poulets, cellules rénales), les virologistes se tournent de plus en plus vers les cultures de lignée continue (PK, HELA). Le virus, après absorption d'une demi-heure à une heure, engendre en 24-36 heures un effet cytopathogène caractéristique et toujours identique qui se manifeste sous forme d'un petit groupe de cellules réfringentes, arrondies et la formation de syncitiums. Après coloration à l'hématoxyline-éosine, on observe dans les noyaux cellulaires des inclusions éosinophiles caractéristiques.

b) Pouvoir pathogène et antigène

Contrairement à la plupart des Herpès virus, le virus de la maladie d'Aujeszky a un pouvoir pathogène très étendu dans l'échelle zoologique. Malgré tout, la virulence du virus varie selon l'espèce, l'âge, l'appareil lésé, et aussi selon la souche du virus.

Chez un porc guéri de maladie d'Aujeszky, on peut mettre en évidence, dans le sérum, la présence d'anticorps neutralisants, précipitants, et fixant le complément et, quelle que soit la souche du virus, on remarque une unicité antigénique remarquable.

C - Etude clinique, épidémiologique et diagnostic

Dans le cadre de notre étude, nous étudierons succinctement les symptômes et l'épidémiologie de la maladie d'Aujeszky, afin de nous consacrer surtout aux différentes méthodes de diagnostic au laboratoire.

1. Symptômes

Chez les espèces animales autres que l'espèce porcine, la maladie d'Aujeszky entraîne une mortalité rapide de 100 % après un intense prurit souvent localisé au point d'entrée du virus.

Chez le porc, il en est tout autrement ; en effet, excepté le

porcelet âgé de moins de 15 jours, la mortalité n'est pas de règle et les symptômes peuvent être séparés en trois groupes :

- Porcelets âgés de moins de 15 jours
  - Mortalité de 100 % en quelques heures,
  - Symptômes nerveux caractéristiques : tremblements musculaires, crises de pédalage, paralysies.
- Porcelets sevrés et porcs à l'engraissement
  - Symptômes frustres : fièvre, disparition de l'appétit pendant une huitaine de jours,
  - Au cours de l'hiver en porcherie d'engraissement : une maladie d'allure grippale avec fièvre, disparition de l'appétit, "coup de flanc" peut évoluer avec quelques mortalités sans symptômes nerveux. On isole dans certains cas le virus de la maladie d'Aujeszky.
- Truies reproductrices
  - Mêmes symptômes que chez les porcs à l'engraissement,
  - Ballonnement et constipation,
  - Pour les truies en gestation : des avortements, de la mortinatalité et des momifications.

2. Epidémiologie

a) Source du virus et résistance du virus

La source quasi exclusive du virus est l'espèce porcine et, comme nous le verrons ultérieurement, la durée d'excrétion pour les porcs malades et surtout pour les porcs infectés de façon inapparente est mal connue ; mais ces derniers sont souvent responsables de la contamination d'élevages sains, d'autant plus que le virus peut résister assez longtemps dans le milieu extérieur.

b) Contagion

Chez le porc, si la contagion directe a un rôle majeur à la faveur de cohabitation ou de saillie, la contagion indirecte a un rôle non négligeable (32).

Chez les autres espèces animales, les carnivores domestiques se contaminent le plus souvent par consommation d'organes de porcelets infectés par le virus de la maladie d'Aujeszky, tandis que les rongeurs ont été accusés de contaminer les bovins et les ovins.

c) Evolution dans un élevage

Comme nous l'avons dit précédemment, le virus est introduit dans une porcherie saine par l'intermédiaire de porcs infectés de façon inapparente.

Le virus peut alors diffuser lentement et ne provoquer l'apparition de la maladie que plusieurs mois après l'introduction des porcs infectés.

Au sein d'un grand élevage, l'évolution de la maladie peut se produire pendant plusieurs semaines et ne rester localisée qu'à certains porcs ou à certains bâtiments.

3. Diagnostic

Le diagnostic formel de la maladie d'Aujeszky ne peut être fait sur le terrain et nécessite un recours au laboratoire pour l'isolement du virus ou la mise en évidence d'anticorps neutralisants, en particulier lors de la circulation du virus à "bas bruit".

a) Sur le terrain

La présence de crises nerveuses, de paralysie avec une mortalité importante chez les porcelets à la mamelle, est le signe le plus évocateur de l'apparition de la maladie d'Aujeszky dans un élevage.

Sur ces porcelets morts, nous découvrons à l'autopsie des lésions d'oedème pulmonaire, de congestion aiguë de la trachée et de petits foyers inflammatoires sur le foie et la rate (30).

Evidemment, ces signes ne sont pas suffisants pour poser un diagnostic et le recours au laboratoire est donc obligatoire.

b) Au laboratoire

+ Examen histologique

Les lésions du système nerveux central correspondant à une méningo-encéphalomyélite lymphocytaire aiguë, non purulente, sont les plus évocatrices (30)

+ Inoculation de substance nerveuse à l'animal vivant

Cette méthode était autrefois, très utilisée car très fiable et facile à réaliser. Actuellement, elle n'est plus mise en oeuvre que dans les laboratoires où la culture de virus s'avère difficile à réaliser.

Le diagnostic s'effectue par une injection de 0,5 ml à 2 ml du matériel suspect dilué au demi, en intra-musculaire au lapin ou en intracérébrale à la souris. Le lapin meurt en3 à 5 jours après le développement d'un prurit intense au point d'inoculation, pouvant entraîner une automutilation. Si le lapin meurt sans grattage, un deuxième passage sur le lapin est effectué à partir d'un prélèvement de sa moelle épinière. Les souris inoculées meurent en 2 à 3 jours après avoir présenté une irritabilité accrue et un comportement névrotique.

+ Identification du virus en culture cellulaire

C'est actuellement l'une des méthodes les plus utilisées pour réaliser le diagnostic de la maladie d'Aujeszky. Pour ce faire, on effectue un broyage des organes (amygdales, rate, ganglions, cerveau ...) des animaux suspects et on dilue le broyat au 1/10e. On y ajoute des antibiotiques et des antifongiques.On peut aussi rechercher du virus sur des sécrétions prélevées sur l'animal vivant : sécrétions naso-pharyngées, génitales, etc..

La suspension obtenue est inoculée sur des cultures de cellules sensibles (cultures de fibroblastes d'embryons de poulet, de rein de porc, de cellules de lignées).

La présence du virus de la maladie d'Aujeszky se traduit au bout de 24.48 heures par un effet cytopathogène caractéristique qui se manifeste sous la forme d'un amas de cellules réfringentes arrondies et

la formation de syncitiums. Dans les syncitiums, les noyaux s'unissent au centre et le cytoplasme qui les entoure devient homogène. Souvent l'isolement s'effectue en tubes de Leighton, ce qui permet une coloration des lamelles à l'hématoxyline-éosine et donc la recherche plus facile des inclusions intranucléaires.

+ Utilisation de l'immuno-fluorescence

La méthode de l'immuno-fluorescence permet de diagnostiquer très rapidement la maladie d'Aujeszky au laboratoire. Malgré tout, elle est peu employée, car elle nécessite une technologie assez complexe, peu compatible avec le diagnostic de routine. On peut l'utiliser selon deux modalités :

- la première utilise comme antigènes les cellules infectées avec le matériel suspect. Après une incubation de 6 à 8 heures, on effectue la coloration de la culture cellulaire avec du sérum hyperimmun anti-Aujeszky conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceïne.

- la seconde, qui s'effectue lorsque l'organe suspecté est riche en virus, consiste en la réalisation de frottis ou de coupes en congélation (cryostat) de l'organe, que l'on colore avec le sérum anti-anti-Aujeszky conjugué.

Dans les deux cas, la fluorescence apparaît sous forme d'une auréole plus ou moins brillante, dans le cytoplasme, autour du noyau, puis se manifeste dans le noyau sous forme de granules plus ou moins volumineux.

+ Recherche des anticorps neutralisants

Cette recherche consiste en une séro-neutralisation sur culture de cellules. Le sérum à tester est mélangé au virus; après une incubation à +37°C, pendant une heure, le mélange est mis en contact avec les cellules sensibles . La lecture s'effectue au bout de 24-48 heures en recherchant la neutralisation de l'effet cytopathogène caractéristique.

Cette méthode de diagnostic est très utilisée pour les études épidémiologiques régionales ou pour mettre en évidence la circulation du virus dans un élevage.

D) Immunité et prophylaxie dans la maladie d'Aujeszky

1) Immunité spontanée

a) Immunité humorale

C'est la composante immunitaire, créée par le virus " sauvage " la mieux connue.

En effet, après l'infection virale, les anticorps neutralisants apparaissent dans le sérum au bout de 8 à 10 jours et leur taux évolue pour atteindre un maximum vers le 20e-30e jour. La durée de vie des anticorps, en l'absence de nouvelle contamination, est très longue; selon certains auteurs (1,28), ils persisteraient toute la vie de l'animal; mais cette hypothèse est très contreversée étant donnée la fréquence des réinfections inapparentes.

Les truies, guéries de la maladie d'Aujeszky ou ayant fait une infection inapparente, transmettent des anticorps aux porcelets par l'intermédiaire du colostrum, et le taux d'anticorps y est souvent supérieur à celui du sérum. Ces anticorps protègent efficacement les porcelets contre une infection naturelle ou provoquée pendant 3 à 7 semaines, mais ne les empêchent pas d'excréter du virus (17).

b) Immunité cellulaire

L'immunité a support cellulaire est encore peu connue et contreversée dans la maladie d'Aujeszky ; malgré tout, certains faits permettent de pencher en faveur de l'existence d'une immunité locale : où la composante cellulaire joue un rôle important sans doute renforcé par des anticorps locaux

&) Bien que, comme nous l'avons dit précédemment, un taux élevé d'anticorps neutralisants n'empêche pas l'excrétion du virus faisant suite à une infection, les voies respiratoires supérieures sont résistantes à une réinfection avec la même souche du virus pendant 3 à 4 mois (22).

&) La protection de porcs vaccinés avec une souche vivante de virus peut-être grande, malgré un taux très bas d'anticorps circulants (29).

&) Les réactions allergiques cutanées de type tardif, spécifiques du virus, mises en évidence après une infection avec du virus " Herpès simplex" ainsi que les tests in vitro (stimulation des lymphocytes, inhibition de la migration des macrophages) ont permis de montrer que l'immunité conférée à la cellule était une composante importante du complexe immunitaire provoqué, chez l'homme, par ce virus. Les mêmes tests ont donné des résultats positifs dans l'infection de bovins par le virus de la rhinotrachéite bovine (36).

Dans la maladie d'Aujeszky, des réactions d'allergie cutanée ont été aussi décrites, ainsi que des tests d'inhibition de la migration des macrophages et de stimulation des lymphocytes. Ainsi après l'infection de porcelets par voie nasale, dès le 4e jour après l'infection, les lymphocytes du sang donnent une réaction positive. Les réactions sont encore plus fortes, dans les jours suivants, avec les lymphocytes des ganglions drainant la région infectée. Au contraire, les anticorps neutralisants et fixant le complément n'apparaissent que vers le 14e jour (36).

Malgré ces résultats positifs, on ignore quel est le rôle exact de l'immunité cellulaire.

2) Immunité vaccinale. Prophylaxie médicale

La vaccination contre la maladie d'Aujeszky pose, comme dans beaucoup d'autres maladies, le problème du choix entre un vaccin à virus inactivé et un vaccin à virus atténué.

Les travaux sur les 2 groupes de vaccins sont très nombreux (13) surtout en Europe de l'Est où la maladie d'Aujeszky provoque d'importantes pertes dansles élevages porcins. En France, où depuis peu d'années la vaccination est autorisée, on utilise essentiellement des vaccins huileux à virus inactivé, la vaccination avec des vaccins à virus atténué étant interdite.

Le vaccin n'empêchant pas l'excrétion du virus, il faut donc éviter de vacciner les élevages de sélection et de multiplication qui commercialisent des reproducteurs. Par contre, pour limiter la circulation

du virus dans les zones infectées et éviter les pertes par mortalité dans les élevages de production, il s'avère nécessaire de vacciner le plus grand nombre possible d'animaux. C'est ainsi qu'en Bretagne et plus particulièrement dans le département des Côtes du Nord où l'on rencontrait il y a quelques années un très grand nombre de foyers cliniques, une vaccination systématique a été entreprise et actuellement, alors que 90 % des élevages sont vaccinés, on ne rencontre pratiquement plus de foyers cliniques de maladie d'Aujeszky.

Le programme de vaccination proposé peut être le suivant :

&) en milieu infecté

- chez les truies

1 ere injection : toutes les truies

2 ème injection : sur les truies entre le 30 e et le 60e jour de gestation ou en fin d'allaitement

Rappel tous les six mois.

- chez les cochettes

1 ere injection : avec les autres truies

2 eme injection : 1 mois après la 1 ere mais 15 jours avant la saillie.

&) en milieu cliniquement sain

- truies

1 ere injection : tous les animaux sauf les truies dont le cycle sexuel se trouve dans la période comprise entre le 8e jour avant la saillie et le 30e jour après la saillie (période la plus sensible s'il y a eu contact préalable avec le virus sauvage sans manifestation dans l'élevage.)

2 eme injection : sur les truies non gravides 2 à 3 jours avant le sevrage

Rappel tous les six mois.

- cochettes

2 injections à 30 jours d'intervalle, la 2e injection étant pratiquée 15 jours avant la saillie au moins

- verrats

2 injections à 30 jours d'intervalle .

Le programme de vaccination doit être bien respecté afin d'éviter quelques rares accidents au moment du rappel. En effet, si la deuxième injection est effectuée sur des truies gestantes, en début et en fin de gestation, la réaction vaccinale de la truie (augmentation de la température, baisse de l'appétit) risque de provoquer un avortement.

D'autre part, il est prudent de ne pas effectuer la vaccination de tous les verrats en même temps car dans les 72 heures suivant le rappel, ils sont très souvent incapables de saillir .

3) Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire, est basée sur deux principes :

a) Introduire des reproducteurs sains

Lorsque des reproducteurs sont achetés, leur statut sanitaire doit être contrôlé en recherchant dans leur sérum des anticorps spécifiques témoins de leur passé pathologique et, en particulier, de la maladie d'Aujeszky.

Un porc survivant à l'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky pouvant être excréteur de virus pendant une assez longue période et un porc vacciné contre la maladie d'Aujeszky pouvant être excréteur du virus sauvage, il est prudent de n'accepter que les reproducteurs ayant une sérologie négative.

Pour pouvoir déceler les élevages infectés, il est donc nécessaire de ne pas vacciner les animaux d'élevages de sélection et de multiplication

et lors de l'achat de ces animaux, une quarantaine de 20 à 30 jours, s'avère nécessaire.

b) Isoler l'élevage

Le virus de la maladie d'Aujeszky étant très résistant dans le milieu extérieur et pouvant donc être introduit dans l'élevage par de nombreux vecteurs mécaniques (camions, bottes, aliment.. etc) il faut isoler l'élevage par rapport au milieu extérieur. Pour ce faire, il faut clôturer l'élevage installer des pédiluves à l'entrée, imposer un changement de vêtements avant l'entrée de visiteurs et éviter la circulation de camions dans l'enceinte de l'élevage par la construction d'un quai d'embarquement pour les porcs charcutiers et par l'installation des silos d'aliment près de la clôture.

4) La maladie d'Aujeszky : maladie légalement contagieuse

Décret du 19.07.77, arrêté ministériel du 02.08.77 et circulaire ministérielle du 06.01.78.

La maladie d'Aujeszky dans l'espèce porcine est réputée contagieuse lorsqu'elle est confirmée par la mise en évidence de l'agent viral à partir des prélèvements effectués sur les animaux.

L'Arrêté préfectoral portant déclaration d'infection précise les mesures applicables dans l'exploitation déclarée infectée :

- mise en interdit de tout ou partie de l'exploitation
- les porcs atteints ou contaminés peuvent être envoyés à l'abattoir
- les porcelets ne présentant pas de signes cliniques peuvent être envoyés dans un élevage d'engraissement sous certaines conditions : élevage " agréé" conditions spéciales de transport etc:..

La levée de l'arrêté portant déclaration d'infection est accordée dans des conditions variables et plus ou moins sévères selon la spécialisation de l'élevage.

Réclamée depuis très longtemps, la déclaration de la maladie d'Aujeszky est enfin devenue obligatoire, mais en instaurant une loi si contraignante, le législateur n'a-t-il pas manqué son but ? En effet, elle comporte peu d'incitations tant à la vaccination qu'à l'élimination des porcs dans les élevages reproducteurs, de même aucune prime d'abattage n'a été prévue, même pour les élevages vaccinés.

Nous venons de voir dans cette partie que si la maladie d'Aujeszky est bien connue du point de vue de son agent pathogène et de son diagnostic expérimental, l'immunité cellulaire et l'application de la prophylaxie posent encore des problèmes.

Deuxième Partie

QUELQUES DONNEES SUR L'EXCRETION GENITALE MICROBIENNE CHEZ LE VERRAT ET D'HERPES VIRUS CHEZ QUELQUES AUTRES ESPECES

Notre but, dans cet exposé, n'est pas de faire le point de toutes les connaissances en matières d'excrétion de microbes, mais après avoir vu ce que nous savons de l'excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky et de sa persistance sous forme inapparente chez le porc, de montrer à l'aide de quelques exemples ce que nous connaissons pour d'autres microbes chez le porc et d'autres herpès chez l'homme et les bovins.

A - Le virus de la maladie d'Aujeszky

Les autres espèces animales que le porc représentant selon la plupart des auteurs, des culs-de-sac épidémiologiques, ou du moins, jouant un rôle minime comme source de virus, le porc peut être considéré comme la seule espèce porteuse du virus de la maladie d'Aujeszky.

Malgré de très nombreux travaux sur la durée du portage et de l'excrétion virale chez les animaux guéris de la maladie d'Aujeszky, cette durée est diversement appréciée selon les auteurs, SHOPE (25) fut le premier, en 1934, à démontrer que le virus de la maladie d'Aujeszky était toujours présent dans les sécrétions nasales du porc, 7 jours après une infection expérimentale par voie intra-nasale.

Lors d'une infection expérimentale de porcelets par injection du virus dans les narines, dès le premier jour suivant l'injection, on peut retrouver du virus dans la cavité nasale. La grande majorité des porcelets excrète, dès le 2e jour, avec un maximum vers le 6 ème- 7 ème jour et un arrêt de l'excrétion vers le 10 ème . Quelques animaux peuvent continuer à excréter sporadiquement du virus jusqu'au 17 ème jour mais, passé ce délai, on arrive plus à retrouver de virus dans les sécrétions nasales et buccales. A aucun moment lors d'infection par voie nasale, on arrive à mettre en évidence une excrétion de virus dans les urines et dans les fecès. Ces résultats sont confirmés par de nombreux auteurs et, en particulier, Mc FERRAN et DOW (16,17) aux Etats-Unis, CORNER (17) aux Etats-Unis et ZUFFA et POLAK (37) en Tchécoslovaquie.

Selon d'autres auteurs, la durée d'excrétion serait plus longue, c'est ainsi que NIKITIN (20) a retrouvé du virus dans les sécrétions nasales, dans l'urine, dans le poumon et le foie, 186 jours après la disparition des signes cliniques. JIVOIN (10) en aurait retrouvé dans les sécrétions nasales 5 à 12 mois après l'infection et SIMEONOV, dan des amygdales, 120 jours après l'infection, avec une excrétion pendant plus de 60 jours dans la salive.

Les avis divergent aussi, quant à la distribution du virus de la maladie d'Aujeszky après infection par une voie donnée. Ainsi, comme nous le confirmerons ultérieurement, la plupart des auteurs ont démontré que lors d'une infection par voie nasale, le virus restait localisé dans les organes avoisinants (ganglions, amygdales) et par conséquent, n'était excrété que par voie nasale et buccale. De même, lors d'une infection par voie génitale, le virus ne se multiplie que dans le prépuce ou le vagin. AKKERMANS (2), au contraire, affirme qu'à partir du prépuce, le virus pénètre dans tout le corps et après quelques jours, on peut l'isoler dans les sécrétions nasales.

Les travaux concernant la recherche de l'excrétion du virus par les voies génitales sont peu nombreux. Les auteurs s'accordant

à dire que le sperme est rigoureusement avirulent et que le fait de trouver du virus dans le prépuce résulte plus d'un reniflement des voies génitales entre congénères que d'une véritable excrétion (2). Seul ULBRICH (34) a réussi à isoler le virus de la maladie d'Aujeszky à partir d'une culture de cellules testiculaires de veau.

Contrairement à ce qui se passe pour certains autres virus du groupe Herpès, il ne semble pas que, même à la faveur de stress (transports, injection de cortisone, etc...), il soit possible de permettre " la réactivation " de virus à particules incomplètes hébergées chez des porteurs de virus (23).

Malgré tout, grâce à la technique d'explants tissulaires, SABO et RAJCANI (23) ont réussi à mettre en évidence du virus de la maladie d'Aujeszky dans certains organes (ganglions, amygdales etc..) 160 à 180 jours après l'inoculation expérimentale de porcelets alors que depuis le 10ème jour suivant l'infection il n'était plus possible de le mettre en évidence dans les sécrétions bucco-pharyngées.

Le fait que l'excrétion virale soit de courte durée et que la " réactivation " du virus semble peu probable ne résoud pas pour autant le problème des porteurs de germes. En effet, les animaux ayant survécu à une infection par le virus de la maladie d'Aujeszky peuvent à la suite d'une nouvelle absorption de virus, devenir pendant quelques temps excréteurs, sans qu'ils ne présentent une quelconque atteinte clinique, et se comporter comme des porteurs inapparents. Le problème se pose surtout pour les porcs vaccinés et, en particulier, les verrats qui peuvent ainsi, suite à une contamination insidieuse devenir excréteurs de virus.

B - Autres virus et mycoplasmes chez le porc

1. Les parvovirus

Nous savons qu'en mélangeant de la semence et du parvovirus, nous obtenons des troubles chez les foetus.

D'autre part, chez un verrat inoculé dans le prépuce, nous pouvons, 5 jours plus tard, mettre en évidence le parvovirus dans le pénis, le prépuce et le testicule.

CARTWRIGHT (6) a pu isoler ce virus du mucus vaginal du sperme et LUCAS et coll. (14) en 1974, en ont mis en évidence dans un broyat de testicules.

Il semble donc que le verrat puisse largement disséminer le virus par voie vénérienne et ainsi entraîner des troubles de reproduction chez la truie.

2. Les entérovirus

Des entérovirus et, en particulier, des " S.M.E.D.I" (°) virus ont été isolés par PHILIPS, en 1972 (21) et LUKERT et Co en 1976 (15) à partir d'échantillons de sperme et de broyats de tissus de l'appareil génital mâle. Il est à noter que ces isolements sont longs et difficiles car ils peuvent exiger jusqu'à 10 passages aveugles en cultures cellulaires avant d'avoir un effet cytopathogène évident. Ces virus ont pu être mis en évidence jusqu'à 17 semaines après l'inoculation.

Le verrat n'est pas sensible au virus du point de vue clinique mais après contamination il devient excréteur de virus et joue ainsi un grand rôle quant à la diffusion du virus.

(°) Stillbirth, Mummification, Embryonic, Death, Infertility

3. Le virus de la peste porcine " chronique "

Bien qu'aucun travail n'est été effectué à ce sujet, il n'est pas impossible de penser que comme les entéro et les parvovirus, le virus de la peste porcine " chronique " soit excrété au niveau des organes génitaux du verrat. Malgré tout, AYNAUD et VANNIER, en 1975 (4) ont montré que ce virus était très sensible à la trypsine et nous savons que le sperme est très riche en protéases.

Les mêmes travaux que ceux effectués pour le virus de la maladie d'Aujeszky seraient souhaitables mais, malheureusement, nous ne disposons pas de test de laboratoire simple, rapide, et sensible, permettant de déceler la présence de tels virus dans le sperme d'un verrat apparemment sain.

4. Les mycoplasmes

La présence de mycoplasmes dans la semence de verrats est aussi contreversée que celle du virus de la maladie d'Aujeszky. En effet, si SCHULMAN et ESTOLA, en 1974, (26) ont réussi à isoler des mycoplasmes dans la semence de verrat, MANDRUP et Co (18) n'ont pu le faire sur 169 verrats, alors qu'au même moment et sur ces mêmes porcs, un isolement de mycoplasmes des cavités nasales était possible. Là aussi, comme pour les virus, le débat reste ouvert.

C - L'herpès virus de l'Homme et le virus de la rhino-trachéite bovine

Après l'infection initiale, l'Herpes simplex peut se maintenir à l'état latent dans plusieurs sites (8) : oeil, système nerveux, organes génitaux (19) et ce, sans lésion apparente des cellules qui l'hébergent. A l'issue d'une longue période (plusieurs mois, voire plusieurs années) durant laquelle l'infection virale ne se traduit par aucune manifestation clinique, le pouvoir pathogène du virus peut se manifester à nouveau et entraîner l'apparition des lésions caractéristiques (31).

Pour les taureaux des Centres d'Insémination Artificielle (C.I.A.) , la présence dans leur sérum d'anticorps contre l'IBR-IPV a amené plusieurs auteurs à se demander quel était le danger réel de cette présence pour la qualité de la semence (9,5).

Il est généralement admis que le sperme se contamine au contact des sécrétions préputiales, le virus n'ayant jamais été retrouvé dans le testicule ou l'épididyme (5). L'excrétion du virus de l'IBR-IPV est très importante pendant les 10 premiers jours et plus discrète ensuite pendant 2 à 3 mois (5,11). Contrairement, au virus de la maladie d'Aujeszky, il a été démontré par KUBIN (11) qu'après un traitement à la cortisone, la semence pouvait contenir à nouveau du virus et ce, 7 mois, après la dernière excrétion spontanée.

La connaissance de l'existence de porteurs latents, capables au bout de plusieurs mois de guérison apparente, d'excréter à nouveau du virus,a rendu les C.I.A très prudents. Mais l'élimination des taureaux ayant des anticorps circulants n'a pas résolu tous les problèmes. En effet, plusieurs auteurs (5, 11) ont signalé soit l'interruption provisoire de la production d'anticorps (2 % des taureaux selon GOFFAUX et PAREZ) soit l'inaptitude complète de certains taureaux à produire les anticorps. Connaissant le caractère aléatoire d'un examen virologique couplé à chaque examen sérologique, SCHULTZ (24) a mis au point une épreuve cutanée capable de déceler l'immunité à médiation cellulaire.

De plus, la vaccination des taureaux n'empêchant pas l'excrétion du virus sauvage lors d'une contamination secondaire à la vaccination, il est recommandé,pour le moment, de ne pas vacciner les taureaux des C.I.A.

De cette étude, il ressort que si la plupart des auteurs pensent que l'excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky est de courte durée, il n'en reste pas moins que l'on a pu l'isoler, dans les explants, près de 6 mois après l'infection initiale. D'autre part, les con-

naissances sur d'autres virus du porc et surtout sur l'Herpès virus de l'homme et le virus de la rhinotrachéite bovine nous incitent à une très grande prudence quant à la possibilité de rencontrer des verrats porteurs latents de virus de la maladie d'Aujeszky pendant plusieurs mois, et capables, au bout de ce délai, d'excréter à nouveau du virus.

Troisième Partie

EXPERIMENTATION SUR LES PORCS

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les connaissances imprécises sur la durée et les conditions d'excrétions du virus de la maladie d'Aujeszky par les voies génitales du verrat, nous ont amené à effectuer deux expérimentations : la première sur des porcs prépubères et la deuxième sur des verrats.

A - Expérimentation sur les porcs prépubères

L'entretien de plusieurs verrats et leur manipulation au laboratoire, posa certains problèmes d'ordre pratique ; nous avons alors choisi de réaliser une partie de notre expérimentation sur des porcelets de 20 kgs, ce qui nous a permis de mettre au point plus facilement un certain nombre de paramètres expérimentaux (en particulier l'influence de la voie d'administration sur les conditions d'excrétion du virus) dont la connaissance était nécessaire, avant de commencer notre étude sur des verrats.

1 - Matériel et méthodes

a) Inoculation des porcelets et prélèvements

&) Les animaux

Nous avons utilisé 30 porcelets, âgés de 2 mois, et provenant d'un élevage conventionnel indemne de la maladie d'Aujeszky.

&) Composition des lots et protocole de l'infection expérimentale

Composition des lots

Les porcelets ont été répartis en 3 lots selon la voie d'administration comme l'indique le tableau n°1.

Lot N°s	Nombre de porcelets	Voie d'administration du virus
1	11	voie nasale
2	11	voie génitale
3	2 + 2	témoins " contacts " non inoculés

Tableau n° 1

Les témoins contacts répartis en 2 groupes, l'un étant en contact avec le lot n°1, l'autre avec le lot n°2, ont été regroupés en un seul lot n°3 pour les résultats , car les taux d'anticorps n'étaient pas significativement différents.

Tableau n°1 : expérimentation sur porcelets : composition des lots selon la voie d'administration du virus

&) Souche de virus

La souche du virus de la maladie d'Aujeszky que nous avons utilisée a été isolée à partir d'un foyer par le Professeur TOMA de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort. Inoculée à la dose de 10^3 DCP 50 /ml cette souche est mortelle.

&) Inoculation des porcelets

Chaque animal a reçu 2 ml d'une suspension virale titrant $10^{6,5}$ DCP 50/ml par voie nasale (lot n°1), ou par voie génitale (lot n°2). Le lot n°3 était constitué de 4 porcelets non inoculés, mis en contact avec les porcelets du lot n°1 (2 porcelets) et avec les porcelets

du lot n°2 (2 porcelets).

NB : le plus souvent le liquide n'est pas ressorti de la cavité où il avait été injecté à l'aide d'une seringue et d'une sonde souple, ce qui témoigne du bon contact entre le virus et la muqueuse).

&) Prélèvements

- le sang

Une prise de sang est effectuée une fois par semaine à la veine cave antérieure des animaux.

- Les sécrétions buccopharyngées

Le mucus est prélevé à l'aide d'un coton introduit au niveau des amygdales et du carrefour pharyngé au moyen d'une pince à forci-pressure. Le mucus est récolté par expression du coton dans une seringue. Lorsque le mucus récolté est en trop petite quantité nous mouillons le coton à l'aide d'un liquide physiologique tamponné (P.B.S.) (°)

- Les sécrétions vaginales

Le mucus vaginal est prélevé à l'aide d'un coton suivant la technique décrite pour le mucus buccopharyngé.

- Les sécrétions préputiales

Le mucus préputial est prélevé grâce à un lavage du sac préputial. Ce dernier est lavé avec 5 ml de liquide physiologique tamponné (P.B.S.) introduit au moyen d'une sonde montée sur une seringue. Après massage de la cavité préputiale, le liquide de lavage est recueilli dans un flacon stérile. Le rythme des lavages était environ d'un par semaine.

(°) P.B.S : phosphate, buffer, saline)

- Prélèvements de certains organes après l'abattage

Aussitôt après l'abattage des animaux, on a prélevé des échantillons des organes suivants :

. amygdales,
. ganglions inguinaux,
. muqueuse préputiale,
. muqueuse vaginale.

b) Traitement des échantillons

Le traitement des échantillons a été légèrement différent à Thivernal et à Ploufragan, mais pour la clarté de l'exposé, nous ne décrirons qu'une seule fois les techniques de laboratoire en soulignant les différences importantes.

&) Le sang

Après coagulation, le sérum est centrifugé, chauffé à + 56°C, pendant 30 minutes et conservé à -20°C, en vue de la recherche d'anticorps neutralisants.

&) Les sécrétions buccopharyngées et génitales - le sperme

Les sécrétions ainsi que le sperme sont séparés en deux échantillons, l'un pour la sérologie, l'autre pour la virologie.

POUR LA SEROLOGIE

Les prélèvements sont utilisés pour la recherche des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky

Pour cela, ils sont conservés à -20°C, puis décongélés centrifugés pendant 10 minutes à 2 000 tours minutes. Le surnageant est chauffé à +56°C,pendant 30 minutes, afin de détruire le virus de la maladie d'Aujeszky pouvant s'y trouver.

A Thivernal, nous n'avons pas recherché les anticorps au niveau local.

POUR LA VIROLOGIE

Les échantillons subissent deux congélations décongélations, afin d'entraîner une destruction cellulaire et, par conséquent, de libérer dans le liquide extra-cellulaire, une quantité maximale de particules virales. La suspension est alors centrifugée à 2 000 tours minutes pendant 5 minutes.

&) Organes prélevés après l'abattage

Les échantillons des divers organes sont conservés à -20°C. Après décongélation, en vue de la recherche de virus infectieux, les échantillons sont broyés dans du P.B.S., à la concentration de 10 % et ensuite centrifugés. On y ajoute des antibiotiques et un antifongique. Le surnageant est inoculé à des cultures cellulaires (PK_{15}) contenues dans des tubes belco.

Dans le même but, des échantillons de testicules et de muqueuse préputiale fraîchement récoltés sont finement découpés et mis en culture selon la technique de SABO et RAJCANI (1976) (23) dans du milieu Eagle-Mem, additionné de 10 % de sérum de veau foetal. A partir de ce milieu, qui est changé tous les 5 jours, le virus infectieux est recherché.

c) Recherche des anticorps neutralisants

La recherche d'anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky par microméthode est effectuée à virus constant et à sérum variable.

Dans chaque cupule, nous plaçons 0,05 ml du sérum à tester et 0,05 ml de la suspension virale représentant 100 DCP 50/0,05 ml Au bout d'une heure de contact à +37°C, nous ajoutons les cellules sensibles (PK_{15}) et le tout est placé , soit en étuve normale après avoir recouvert la micro-plaque d'adhésif, soit en étuve à CO_2.

La première lecture s'effectue au bout de 24 heures et, sont considérées comme négatives, les cupules où il y a une attaque du

tapis de cellules par le virus signifiant donc que le sérum ne contient pas d'anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky.

Les cupules où le tapis n'a pas été attaqué sont lues matin et soir pendant 4 jours et au bout de ce délai, le sérum correspondant est considéré comme positif.

Lorsqu'un sérum a été trouvé positif, nous le titrons par la méthode des dilutions successives. Le titre en anticorps est exprimé soit par la valeur de la dernière dilution du sérum capable de neutraliser 100 DCP 50/0,05 Ml de virus, soit par le log à base 2 de cette dilution.

La recherche des anticorps dans le sperme et le liquide préputial est effectuéede manière analogue à la séro-neutralisation décrite précédemment.

d) Recherche du virus infectieux

Le virus infectieux est recherché à l'aide de son pouvoir cytopathogène pour des tapis de culture de cellules PK_{15}.

&) Sécrétions et sperme

Des expériences préliminaires réalisées en mélangeant une suspension de titre connu et la semence ou le liquide préputial, ont permis de déterminer la dilution nécessaire de ces prélèvements pour éviter un effet toxique pour les cellules. Les résultats sont les suivants :

- sperme = dilution 1/2
- lavage préputial = dilution 1/4

Le surnageant de centrifugation est donc dilué dans du milieu MEM (minimum-Eagle Medium) laboratoire EUROBIO. contenant des antibiotiques et un antifongique.

0,2 ml de la suspension est inoculé sur un tapis cellulaire (lignée PK_{15}) âgé de 24 heures. Après absorption d'une heure à +38°C, les tapis sont rincés deux fois et remis à l'étuve avec 2 ml de

milieu MEM contenant 2 % de sérum de veau foetal.

Les tapis cellulaires sont observés quotidiennement pendant 8 jours. Si, un effet cytopathogène se manifeste, le tube est congelé et un deuxième passage est réalisé dans les mêmes conditions afin de confirmer la présence d'un effet cytopathogène spécifique. En l'absence d'effet cytopathogène, le tube est congelé après 8 jours et trois passages sont effectués sur cellules PK_{15}.

Au premier isolement d'un virus de la maladie d'Aujeszky, la nature du virus a été vérifiée par immunofluorescence avec un sérum monospécifique marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Pour cela la suspension est absorbée sur le tapis cellulaire de lamelles contenues dans des tubes de Leighton, et, après incubation, le tapis est fixé et coloré avec les anticorps fluorescents.

&) Organes prélevés après l'abattage

- La suspension obtenue après centrifugation est inoculée sur cellules PK_{15} dans des conditions identiques aux liquides de lavages préputiaux et aux prélèvements de semence.

- Le liquide récolté lors du changement de milieu des fragments d'organes mis en culture est traité de la même manière que les sécrétions.

2 - Résultats

a) Présence du virus dans les sécrétions

Les résultats sont présentés dans le tableau n°2

TABLEAU n°2 : Excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky dans les sécrétions buccopharyngées et génitales de porcelets inoculés par voie nasale et par voie génitale dans les conditions expérimentales.

Lot n°s	Voie d'inoculation du virus		Présence du virus dans les secrétions	
	nasale	génitale	Bucco pharyngées	préputiale vaginale
1	II (1)		4/11 (2) (3)	0/11
2		11	0/11	2/11 (3)
3	2 + 2 "témoins contact "		0/4	0/4

(1) Nombre d'animaux

(2) Nombre d'animaux excréteurs de virus/nombre total d'animaux

(3) Présence du virus du 5ème au 11 ème jour après l'infection

Chez 4 des 11 porcelets inoculés par voie nasale (lot n°1), on a pu déceler du virus infectieux uniquement dans les sécrétions buccopharyngées du 5 ème au 10 ème jour après l'infection.

Chez 2 des 11 porcelets inoculés par voie génitale (lot n°2), on a pu déceler du virus infectieux uniquement dans les sécrétions génitales et, également du 5 ème au 11 ème jour après l'injection. Par ailleurs, il n'a pas été possible de mettre en évidence une excrétion du virus dans les sécrétions des 4 animaux témoins de " contact ".

b) Recherche du virus dans les organes prélevés à l'abattage soit 30 jours après l'inoculation

A partir des fragments d'organes (amygdales et ganglions inguinaux), mis en culture, il n'a pas été possible de déceler la présence de virus infectieux. Sur les porcs inoculés par voie génitale, nous avons noté lors de l'abattage, une hypertrophie des ganglions inguinaux.

c) Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants dans le sérum

Les anticorps neutralisants sont décelables, dans le sérum des 22 animaux inoculés, à partir du 10 ème jour et les titres maximums sont observés au 26 ème jour.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°3; il faut noter que bien que n'étant apparemment pas excréteurs de virus, les 4 animaux " témoins de contact " ont également présenté une séroconversion semblable à celle observée chez les animaux inoculés.

TABLEAU N°3 : Cinétique d'apparition des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky dans le sérum des porcelets inoculés par voie nasale (lot n°1) , par voie génitale (lot n°2) et des porcelets témoins de " contact " (lot n°3).

Voie d'inoculation	Nombre de porcelets	Activité neutralisante du sérum - jours après l'inoculation				
		J_0	J_7	J_{14}	J_{21}	J_{26}
génitale	11	0 (1)	0	2,1	4,6	5
nasale	11	0	0	1	3,8	4,4
témoins "contact "	2	0	0	1,8	3,8	5

(1) Moyenne des valeurs des titres d'activité neutralisante des sérums des poulets, exprimés en log base 2 de la dilution finale neutralisant 100 DCP 50 de virus.

B - Expérimentation sur les verrats

a) Inoculation des porcs et prélèvements

&) Les animaux

Au départ, nous disposions de quatre verrats venant du centre de Maxent. Devant loger dans des cages individuelles et sur caillebotis en fer, nous les avions choisis de faible poids, mais leur inexpérience due à leur jeune âge, conjuguée aux conditions d'élevage ayant retardé de deux mois le départ de l'expérience, nous avons décidé d'en prendre deux autres au Centre d'Insémination Artificielle de Loudéac. Malheureusement, au bout de quelques jours, l'un d'eux, victime d'un mal de pattes l'empêchant de saillir, fut abattu.

Nous avons donc travaillé avec 3 verrats, mais , malgré le travail assidu de techniciens compétents, seul, celui du centre de Loudéac, nous a permis d'effectuer des prélèvements réguliers de semence.

&) Protocole de l'infection expérimentale

L'inoculation a consisté en une injection de 5 cm3 de la suspension virale titrant $10^{6.5}$ DCP/ml dans le prépuce de chaque verrat et au massage de la cavité préputiale pendant quelques instants afin d'éviter l'écoulement de la suspension hors de cette poche et de favoriser le contact du virus avec la muqueuse.

&) Prélèvements

. Sang

Une prise de sang est effectuée toutes les semaines et la première a lieu le 3 ème jour après l'infection. Contrairement, aux porcelets, nous l'effectuons à la veine auriculaire pour ne pas trop énerver les verrats.

. Lavages préputiaux

La méthode de lavage est identique à celle des porcelets.

. La semence

La récolte est effectuée deux fois par semaine, mais, comme nous l'avons

indiqué auparavant, seul le verrat " Lipide " nous a permis de recueillir régulièrement des échantillons de semence. Lors du prélèvement de semence toutes les précautions étaient prises pour que le sperme et le flacon qui le recueille ne se contaminent pas au contact de la muqueuse préputiale ou avec ses sécrétions.Aussi,seule la dernière fraction de l'éjaculat a été récoltée.

Les prélèvements de semence et de lavages préputiaux ont été poursuivis pendant 77 jours.

. Prélèvements de certains organes après l'abattage: Aussitôt après l'abattage des animaux, des échantillons d'organes suivants ont été prélevés :

+) amygdales
+) ganglions inguinaux
+) vésicules séminales
+) testicules (partie profonde)
+) épididyme
+) protaste
+) muqueuse préputiale

b) Traitement des échantillons

Ce chapitre a été traité dans la troisième partie.

Résultats

Pendant toute l'expérience, la température rectale des verrats est restée normale, même dans les jours qui ont suivi l'inoculation.

Lors des expériences préliminaires faites en mélangeant du virus et de la semence, nous avons effectué deux constatations:

&) Le sperme,contrairement à ce que l'on pensait,est moins toxique pour les cellules que le liquide préputial. De plus, ce dernier est d'autant plus toxique qu'il contient une grande quantité d'urine (visible à la couleur du prélèvement).

&) Le virus de la maladie d'Aujeszky qui, habituellement, entraîne un effet cytopathogène au bout de 36.48 heures, lorsqu'il est mélangé à de la semence ne commence à détruire les cellules qu'au bout de 4 jours. Malgré tout, l'effet cytopathogène est encore visible au bout de 6 à 7 jours.

a) Présence de virus dans les sécrétions préputiales

Les résultats sont présentés dans le tableau n°4

TABLEAU n°4 : Recherche de l'excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky dans les sécrétions préputiales de 3 verrats inoculés par voie génitale dans les conditions expérimentales

Nom ou numéro du verrat	Présence du virus de la M.A. dans les liquides de lavage préputial récoltés après infection						
	J_3 (1)	J_{10}	J_{14}	J_{18}	J_{21}	..	J_{71}
Lipide	($10^{3,7}$+(2) DCP/ 50ml)	($10^{4,7}$+ DCP/ 50ml)		-			-
1815	(+)	(+)	-	-	ND(14)		ND
1844	(+)	-(3)	-	-	ND		ND

(1) J_3 = 3ème jour

(2) + = présence de virus

(3) - = absence de virus détectable

(4) ND = non déterminé

Le virus de la maladie d'Aujeszky a été détecté dans tous les liquides de lavages préputiaux prélevés sur les 3 verrats au 3 ème

jour et sur 2 verrats au 10 ème jour après l'injection. De plus, on observe une augmentation du titre infectieux du virus présent dans les sécrétions préputiales de l'un des verrats (" Lipide ") du 3 ème jour ($10^{3.7}$ DCP 50/ml) au 10 ème jour ($10^{4.7}$ DCP 50/ml). Après cette date, il n'a pas été possible de déceler de virus infectieux.

b) Présence de virus dans le sperme

Les résultats de la présence de virus dans les prélèvements de semence sont présentés dans le tableau n°5.

TABLEAU n°5 : Excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de 3 verrats inoculés par voie génitale dans les conditions expérimentales

Nom ou numéro du verrat	Présence du virus de la M.A dans les prélèvements de sperme jours après l'infection						
	J_3 (I)	J_8	J_{11}	J_{15}	J_{18}	...	J_{77}
Lipide	($10^{3.7}$ DCP $^{+2}$ 50/ml	$10^{4.9}$ DCP $^{+}$ 50/ml	-	-	-		-
1815	+	ND	-	-	ND		ND
1844	+	ND	ND	-	ND		ND

Le virus de la maladie d'Aujeszky a été détecté dans les prélèvements de sperme récoltés le 3 ème jour chez les 3 verrats et dans le prélèvement recueilli le 8 ème jour chez le seul verrat sur lequel la récolte a été possible.

Tous les autres prélèvements ultérieurs se sont révélés négatifs. Il faut noter l'augmentation du titre infectieux du virus du 3ème jour ($10^{3.7}$ DCP 50/ml) au 8 ème jour ($10^{4.9}$ DCP 50/ml) chez le verrat Lipide.

c) Recherche de virus dans les organes prélevés à l'abattage

Les verrats " Lipide ", 1815, et 1844 ont été respectivement abattus 79, 30 et 50 jours après l'inoculation du virus.

A partir des cultures de fragments de ganglions ou d'organes génitaux ou à partir de broyat de ce matériel, il n'a pas été possible de détecter du virus infectieux en culture cellulaire.

d) Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants dans le sérum, le sperme et les sécrétions préputiales

8 jours après l'inoculation, les anticorps neutralisants sont décelés dans le sérum de deux verrats (Lipide et 1815) et seulement à partir du 15 ème jour dans le sérum du 3 ème verrat (1844).

Les titres maximaux sont observés au 29ème jour.

Les échantillons de sperme et de liquide préputial n'ont pas présenté d'activité neutralisante décelable vis-à-vis du virus de la maladie d'Aujeszky pendant toute la durée de l'expérimentation.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°6.

TABLEAU n°6 : Cinétique des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky dans le sérum de 3 verrats inoculés par voie génitale dans les conditions expérimentales

Nom ou numéro du verrat	Activité neutralisante du sérum				
	J_3 (1)	J_8	J_{15}	J_{22}	J_{29}
Lipide	-(2)	1/2	1/8	1/64	1/128
1815	-	1/2	1/16	1/64	1/64
1844	-	-	1/16	1/64	1/64

(1) J_3 = 3ème jour après l'inoculation

(2) = activité neutralisante non décelable

C - DISCUSSION

Nos résultats démontrent la sensibilité des voies génitales du porc à l'inoculation locale par le virus de la maladie d'Aujeszky.

Par comparaison avec les porcelets infectés par voie nasale, il faut noter que l'excrétion virale est détectable uniquement au lieu d'inoculation. Quel que soit l'âge (porcelets de 2 mois, verrats de n mois), la dose ($10^{3.7}$ ou $10^{6.5}$ DCP 50/ml) de l'inoculum ou la voie d'inoculation (nasale ou génitale), 6 porcelets sur 26 et les 3 verrats présentent une excrétion de virus détectable au niveau des sécrétions pendant la même période, d'ailleurs assez brève, (du 3e au 5e jour au 10e -11e jour). Cette excrétion semble bien refléter une multiplication virale active et locale, puisque le virus a été isolé des dernières fractions de l'éjaculat 8 jours après l'inoculation expérimentale. De plus, le titre infectieux de virus a nettement augmenté entre deux prélèvements consécutifs de semence et de liquide de lavage préputial, effectués à 7 jours d'intervalle.

Des expériences préliminaires (35) avaient, par ailleurs, montré que la semence de verrat est dépourvue d'effet virulicide vis-à-vis de la maladie d'Aujeszky.

De plus, aucune activité neutralisante n'a été decelée dans les divers prélèvements successifs de semence ou de liquide de lavage préputial, réalisés au cours de cette expérimentation. En revanche, chez tous les animaux inoculés et chez les 4 porcelets témoins contact, nous avons mis en évidence une apparition d'anticorps neutralisants dans le sérum à partir du 8e-10è jour. Le contraste entre la présence d'activité neutralisante à un niveau élevé dans le sérum de verrat et son absence dans le sperme confirme des observations antérieures réalisées à partir de 10 verrats vaccinés contre la peste porcine appartenant à un Centre de

sélection et à partir desquels, on avait remarqué une situation analogue pour les anticorps neutralisants anti Peste porcine et anti entéro-virus de type I (TALFAN) dans le sérum et la semence (3).

L'apparition d'anticorps neutralisants dans le sérum des 4 porcelets témoins de contact, suggère qu'ils se sont infectés au contact des animaux inoculés. Le fait qu'ils n'aient pas présenté d'excrétion virale détectable n'a pas de valeur significative en raison du faible nombre d'animaux inoculés (6 sur 26) qui se sont révélés excréteurs de virus.

A la différence de SABO et RAJCANI (23) qui avaient isolé du virus infectieux à partir des cultures de fragments d'organes (amygdales, ganglions, muqueuse nasale) prélevés chez des porcs, 160 jours après une infection expérimentale par voie nasale, nous n'avons pas réussi à détecter la présence du virus dans les organes de l'appareil génital des verrats 30, 50 et 79 jours après l'infection expérimentale par voie préputiale.

Cependant, on sait que l'excrétion virale d'un porteur cliniquement sain n'est qu'intermittente et varie probablement d'un individu à l'autre ; de plus, la probabilité d'isoler un virus excrété peut être augmentée en multipliant le nombre de prélèvements et le nombre d'animaux. Dans notre cas, le nombre fournissant régulièrement de la semence est faible, ce qui diminue les chances d'isoler le virus.

Sans pour autant avoir d'explication, nous avons noté, lors de l'abattage, une hypertrophie importante des ganglions inguinaux chez tous les animaux inoculés par voie génitale.

La disparation apparente du virus après le 10e ou le 11 e jour pourrait également être en rapport avec le développement d'une immunité locale spécifique et de type cellulaire.

Sur le plan pratique, nos résultats conduisent aux conclusions suivantes :

. Dans nos conditions d'expérience, l'excrétion du virus par les voies génitales du verrat, semble limitée à une dizaine de jours après l'infection. Dans ces conditions, et compte tenu du contrôle sérologique régulier entrepris chez les verrats des centres d'insémination artificielle, la probabilité de la transmission de la maladie d'Aujeszky par le biais de l'insémination artificielle reste faible. Dans ce domaine, l'insémination artificielle à partir de verrats contrôlés sérologiquement, offre donc le maximum de garantie à l'éleveur soucieux de maintenir la qualité de son cheptel.

CONCLUSION

Au cours de notre étude sur l'excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky, par les sécrétions génitales du verrat, après avoir rappelé succinctement quelques connaissances générales sur la maladie d'Aujeszky, nous avons étudié quelques exemples d'excrétion microbienne chez le verrat , les bovins et l'Homme.

Chez le verrat, les connaissances sont encore à l'état embryonnaire, car nous ne disposons pas de tests de laboratoire simples rapides, sensibles, permettant de déceler la présence de certains virus dans le sperme d'un verrat apparemment sain. De plus, même si nous en disposions, la présence d'entérovirus ou de parvovirus dans la semence, ne signifierait pas,pour autant, que ces virus sont pathogènes pour l'embryon ou le foetus.

Pour le virus IBR-IPV, des bovins, le problème est quelque peu différent, car ce virus, à l'inverse de ceux étudiés précédemment, peut entraîner des manifestations génitales, par conséquent, il est difficile de ne pas penser à la possibilité de transmission de l'IBR par cette voie.

Nous avons vu, dans notre introduction, les raisons pour lesquelles nous avons choisi le virus de la maladie d'Aujeszky pour servir de support à notre étude. Cela nous a permis de constater que d'une part, le virus est effectivement excrété par la semence du verrat et que, d'autre part, cette excrétion est de courte durée (une dizaine de jours). Malgré nos résultats négatifs, les expériences de SABO et RAJCANI (23). nous incitent à la prudence. En attendant le vaccin idéal qui empêcherait l'animal d'être réceptif au virus sauvage, il apparaît souhaitable de ne pas soumettre les verrats des C.I.A. à la vaccination, mais d'effectuer régulièrement des prélèvements sérologiques et d'éliminer les verrats à sérologie positive.

VU , le Professeur de l'Ecole
Rapporteur
Pr. CHANTAL

VU, Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire
Pr. LAUTIE

VU, le Président de la Thèse
Pr. ARMENGAUD

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 23 Mars 1981

P/ Le Président de l'Université Paul Sabatier.
et par délégation
LE VICE-PRESIDENT,

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE

Professeur L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

1)AKKERMANS (J) - N.V.Drukke Ris de Eendracht - Schiedam, edt. 1963

2) AKKERMANS (J) et coll. - Observations on Aujeszky's disease in the Netherlands - Bull. Off. Int. Epiz. 1975, 84, 179.194

3) AYNAUD (J.M) - Résultats non publiés, 1975

4) AYNAUD (J.M), VANNIER (P), CORTHIER (G), LAUDE (H) et TILLON (J.P.) - Peste porcine chronique : propriétés in vitro et in vivo de 7 souches de virus isolées dans des élevages présentant des troubles de la reproduction - Bull.Acad. Vet. de France, 1977q 80, 371.384

5) BITSH (V) - Infectious bovine rhinotraceite virus -Infections in bulls, with special reference to preputial infection - Applied Microbiology, 1973,26, 337.343

6) CARTWRIGHT (S.F), LUCAS (H.M) et HUCK (R.A) - A small haemagg lutinating porcine DNA virus .I. Isolation and properties - J.Comp. Path. 1969, 79, 371.377

7) CORNER (A.H) - Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets Res. Vet.Sci. 1965, 6, 337.343

8) DOCHERTY (J.J) et CHOPAN (M) - The latent herpes simplex virus - Bacteriol. Reviews, 1974, 38, 337.355

9) GOFFAUX (M) et PAREZ (M) - I.B.R-I.P.V. et insémination artificielle des bovins. Rapport n°117 présenté à la session générale de l'O.I.E. Paris, mai 1975

10) JIVOIN (P) - Problème Epizoo. Microbiol. 1956, 5, 35

11) KUBIN (G) - Virologie, Serologie und Pathomorphologie des gesch lecht sorgane des rindes nach der Infektion mit dem Bläsche-naussch lag. - Virus Congrès de Wels, 1973

12) LAUTIE (R) - La maladie d'Aujeszky , 1969, - L'Expansion edt. Paris

13) LAUTIE (R) - Les éléments du choix d'un système de lutte rationnelle contre la maladie d'Aujeszky - Cah.Méd.Vét. 1974,43 361.366

14) LUCAS (H.M)CARTWRIGHT (S.F) et WRATHAL (A.E.) - Genital infection of pigs with porcine parvovirus - J.Comp.Path. 1974,84;347.350

15) LUKKERT (P.D.), BLUE (J.L), HOLZINGER (E.A)et WILLIAM (D.J) - Swine picornavinal infections of the male genital tract, Report n°DD 10 - 4e congrès I.P.V.S. juin 1976, Ames, USA

16) MC FERRAN (J.B) et DOW (C) - The excretion of Aujeszky's disease virus by experimentally infected pigs - Res.Vet.Sci. 1964,5 405.480

17) MC FERRAN et coll. - Aujeszky's disease in pigs - Vet.Bull. 1973, 43 9, 465.480

18) MANDRUP (M), FRILS (N.F), MEYLINF (A) et MEDING (J.H) - Studies of the possible occurence of mycoplasmas in boar semen - Nord. Vet.Med. 1975, 27, 557.561

19) NAHMIAS (A.J), JOSEY (W.E.) et NAIB (Z.M.) - Viral infections of the urogenital tract, proceeding of the symposium on genital infections and their complications; edited by Dan Danielsson, 1975, 63.68, Almquist and Wilsell international Stockholm

20) NIKITIN (M) - Veteriniya 1961, 38, 9.32

21) PHILIPS (M.M),FOLEY (C.W.) et LUKERT (P.D.) - Isolation and characterization of viruses from semen and the reproductive tract of male swine - J.Am.Vet.Med. Ass. 1972, 161, 1306.1316

22) SABO (A) et BLASKOVIC (D) - Resistance of pigs tonsillary and throat mucosa to reinfection with a homologous pseudorabies virus strain - Act. Virol. Prague, 14, 17/24 and plate.

23) SABO (A) et RAJCANI (J) - Latent pseudorabies virus infection in pigs - Acta Virologica 1976, 20, 208.214

24) SCHULTZ (R.D.) - Communication personnelle, 1975

25) SHOPE (R) - Science N.Y. 1934, 80, 102

26) SHULMAN (A) et ESTOLA (T) - Isolation of mycoplasmas from boar semen - Vet Rec. 1974, 94, 330.331

27) SIMENOV (S) - Veterinarmomeditsinski nauki , sofia, 1973,10, 1, 67.72

28) SKODA (R) et coll. - Arch. Exp.Vet.Med. 1963, 17, 1363

29) SKODA (R) et coll. - Immunisation against Aujeszky's disease with live vaccine - Act. Virol. 1964, Prague 9, 1.9

30) SZABO (I) et coll. - Le diagnostic de la maladie d'Aujeszky - Cah.Med. Vét. 1974, 43, 306.313

31) THOMAS (F) et PAINE (J.R.) - Latent herpes simplex infection in man - Bact. Rev.1964, 28, 4, 472.479

32) TOMA (B) et GORET (P) - La maladie d'Aujeszky en France - Cah. Méd. Vét. 1974, 43, 225.236

33) TRAUB (E) - Cultivation of pseudorabies virus - J.Exp.Med.1933, 58, 663.681

34) ULBRICH (F) - An accidental isolation of Aujeszky's disease virus from calf testicular all culture - Arch. Exp.Vet.Med. 1971,25 6, 937.941

35) VANNIER (P) et GUEGUEN (B) - Excrétion de la maladie d'Aujeszky par les voies génitales mâles du porc. Persistance du virus dans la semence de verrat - Journées de la recherche porcine 1979, 401.406

36) WITTMANN (G) et coll. - L'immunité conférée à la cellule dans l'infection par le virus d'Aujeszky chez le porc - Bull.Off.Int.Epiz. 1975, 84, 239.243.

37) ZUFFA (A) et POLAK (L) - Bull. Off. Int. Epiz. 1972, 77, (7.B) 1095.1103.